

## 第 8 期（2024 年度）第 7 回創発セミナー報告 第 12 回 酵母コンソーシアム

### 『生物の潜在能力を拓く大規模ゲノム改変技術』 -生命機能の拡張と新たな応用展開-

大隅基礎科学創成財団は 2025 年 6 月 4 日午後 4 時から、『生物の潜在能力を拓く大規模ゲノム改変技術』というテーマのもと、オンラインで創発セミナーを開催しました。冒頭、本セミナーの世話人である松浦彰氏(千葉大学)から、今回の酵母コンソーシアム創発セミナーの概要について話がありました。その後、2 人の講演者による講演と質疑で 2 時間ほど活発な討論が行われました。以下にその要旨を報告します。

#### ■ 概 要 ■



#### 講演 1 「大規模ゲノム再編による生命機能の拡張」

最初に、東京大学 大学院総合文化研究科の太田邦史氏（東京大学 大学院総合文化研究科 教授）より、染色体再編成を大規模に引き起こす 実験系である TAQing システムについての講演がありました。冒頭、生物における「多様性」と「ゆらぎ」の重要性について概説され、生物が多様である理由として、各個体が常に理想的な環境に生きているわけではなく、変化する環境に柔軟かつ迅速に適応する必要がある点が強調されました。地球上では過去に幾度も大量絶滅が発生していますが、生物は「最適解」に固執することなく、むしろ「無駄」や「ゆらぎ」を保持することで生存可能性を高めてきました。均一な遺伝子集団は環境変動に弱く、逆に多様性を有する集団は適応力が高いとされています。この観点から、危機は新たな多様性を獲得する契機となり得ることが説明されました。次に、環境変動への適応のメカニズムについて、物理学の「カオス理論」が紹介されました。「カオスの縁」という秩序と無秩序の狭間にある状態が、生物の進化や創発的多様性の源となる可能性が指摘され、例として、ChatGPT による俳句生成が挙げられました。創造的な成果を得るには、適度なランダム性が必要であり、これは生物の進化にも共通する原理であるとのこと。従来の育種は、環境変動に対する自然選択に基づき、新たな表現型を得る方法でしたが、時間と労力を要します。これに代わる技術として、変異誘発処理、組換え DNA 技術、ゲノム編集などが発展してきました。中でも、人工的にゲノムを合成する「ボトムアップ型」の技術（例：クレイグ・ベンター氏による人工ゲノムの作成）は画期的ですが、コストや時間の面で課題があります。その一方で、日本の研究環境には「トップダウン型」が適しており、その代表例として「SCRaMbLE」技術が紹介されましたが、特許やゲノムに人工的に組換えのための配列を挿入した細胞の使用という制約もあります。そこで、太田教授が開発された「TAQing システム」が新たな選択肢として提案されました。

この技術は、温度依存的な制限酵素 TaqI を用いてゲノム DNA を切断し、染色体再編成を誘導するものであり、多様な染色体再編成を引き起こすとともに、点変異の発生が少ないという利点を有しています。出芽酵母を用いた実験では、多数の転座や組換えが発生し、SNP 解析により変異の由来が明らかにされました。13 株を解析した結果、短い遺伝子変換、染色体転座、切断誘導が観察され、点変異の発生は極めて少数であることが確認されました。TAQing システムは出芽酵母以外にも応用されており、高温でキシロースを資化できる酵母、形態変化を起こしたシロイヌナズナ、熱耐性・塩耐性を持つイネなど、さまざまな有用変異株が得られています。*Aspergillus niger* においては、休眠していた二次代謝産物遺伝子クラスターを活性化させることにも成功しています。さらに、他の制限酵素（例：MseI）を用いることで、より多様な染色体再編成が可能となり、「TAQing2.0」では細胞膜貫通ペプチドを用いて制限酵素タンパク質を直接細胞に導入する方法も開発され、外来遺伝子を使わずにゲノム改変を行う技術として期待されています。応用例として、pH1.8 で生育可能なトルラ酵母の取得や、少ない変異数で原因遺伝子の特定が可能になる点が報告されました。さらに、青色光で活性化する制限酵素（MagMboI）を設計し、光により可逆的にゲノム再編成を制御する研究も進んでいます。

質疑応答では以下のような議論が行われました。

・TAQing で切断されているところは全て同じ確率で切断されているのか？

—全ゲノム解析をすると、クロマチン構造は重要であり、DNA が露出しているオープンな場所が切れやすい。減数分裂で Spo11 の切断領域は限定されるが、制限酵素では DNA が開いていればどこでも切るため、かなり複雑な染色体の再編成が可能であることがわかっている。

・ランダムに新たな表現型を作り出せるということは生物にはもともと優れた表現型が存在しているのか？

—これは都合の良い形質を探しているためで、都合の悪いダメージのある形質になっている（死んでいる）ものも多い。ただし思っている以上に潜在能力は高いと考えている。

・どうやっても取れない表現型の例はあるのか？

—現在は取れる株から選んでいる。これらの実験を通じて取りにくいものと取れやすいものがあることもわかっている。

・今回取得した変異株の表現型は 1 遺伝子変異だけで起こっているのか？

—かなりの表現型はヘテロ接合性の喪失やコピー数変動が影響していることがわかってきた。そのため、変異部位を見つける作業はそれほど困難ではなかった

・人のガンの転座などでエキソン同士が結合して新たな遺伝子ができたような例はあるのか？

—まだ ORF が転座して新たな遺伝子ができて例は見つかっていない。

・ゲノム重複させてから TAQing を試すのは面白いのではないか？

—その通りで、2 倍体より 4 倍体の方が変化が複雑であり、ゲノム重複する生物学的意味がわかってきた。例えば植物では 4 倍体の方が複雑な変異が起こりやすく、倍数性の変化と進化が関連することも見えている。

・TAQing で目的の変異株が取れない場合にはどのような工夫をしたらよいか？

—これは倍数性を上げることとともに、制限酵素をよく切れるものを使う。具体的には MseI が最

も有効でこの酵素での実験を進めている（ただし精製が難しいのが問題である）。

・制限酵素の発現量が問題とならないのか？

—もちろん少量だと変異が起きない。現在は、制限酵素遺伝子を導入するよりは酵素タンパク質を使用した方が効果的である。

・タンパク質を導入する場合には輸送シグナルをいれているのか？

—制限酵素にはNLS（核移行シグナル）をすべて付加している。

・どのような生物に適用しているのか？

—現在は10種類以上の生物で試しており、今後さらに対象を増やしていきたい。

・この研究を進めていくと、応用可能な全ての有益な変異を網羅的に把握して権利化したり、AIにフィードして予測モデルを作ることが可能となるのではないかと？

—我々は網羅的に得たストレス耐性の変異株を統計解析により機械学習させているが、スケールを上げると表現型とゲノム配列の対応が予測可能となることが期待される。これにより、特定の表現型を示すゲノムが推定可能となるため、アメリカなどがこの手の研究に注力してくる可能性もある。注目される前に日本でそのような研究ができれば良いと考えている。

・原核生物にも適用可能（放線菌で行なっている）か？

—共同研究先でできることがわかっているので、放線菌でも試してみたい。



## 講演2 「非従来型酵母のポテンシャルを引き出す”ものづくり”」

続いて、三菱商事ライフサイエンス株式会社 主任研究員の安川泰史氏による講演が行われました。同氏は、産業利用が進むトルラ酵母に対して、遺伝子編集技術である「TAQing法」を応用し、新たな育種技術の可能性を探る研究をされています。はじめに、安川氏は育種対象であるトルラ酵母の特徴について解説されました。トルラ酵母は、かつて *Candida utilis* として分類されていましたが、現在は *Cyberlindnera jadinii* とされています。名称の「トルラ (Torula)」は「数珠状」を意味しており、食品や飼料などにおいてシングルセルプロテイン（単細胞タンパク質）として広く利用されています。米国FDAにおいてもGRAS（Generally Recognized As Safe）認定を受けており、長年の食経験を有する安全性の高い微生物です。この酵母は、アルコール発酵を行わない、高密度培養が可能であり、単純な合成培地でも良好な増殖性を示すといった利点を持っています。トルラ酵母のゲノムサイズは約13Mbpで、染色体は6本、主に3倍体であるとされています。遺伝子数はおおよそ6,100と推定されています。現在では、トルラ酵母は酵母エキスやサプリメント、化粧品素材などに活用されており、アニマルフリー・アレルゲンフリー・非遺伝子組換えといった特長も兼ね備えています。しかしながら、育種においてはいくつかの課題が存在しています。トルラ酵母は無性生殖のみにより増殖し、孢子形成が困難であるため、従来の交配を基盤とした育種が行えず、伝統的な突然変異誘導法に依存しているのが現状です。その結果、点変異が主体の変異株では、生育不良などの問題が頻発しています。また、連続培養ではコンタミネーションの影響が大きく、復帰変異による生産性の低下も懸念されています。

こうした背景を受けて、安川氏らは、ゲノムに大規模な再編成を誘導可能な TAQing2.0 法を用いて、トルラ酵母の育種に新たなアプローチを試みられました。TAQing 法による実験では、1 回の操作でゲノム全体にわたる広範な再編成が誘導され、従来技術では得られなかった多様な変異株を取得することが可能となりました。具体的な成果として、TAQing 法により pH 耐性株の選抜が効率的に行われました。特に、低 pH 耐性を示した m1 株では、従来の変異誘導法で検出された 1,333 箇所の変異に対して、わずか 3 箇所にしかな変異が確認されませんでした。また、通常の培養 pH (4.6) においては野生株と遺伝子発現にほとんど差が見られなかった一方で、低 pH 条件 (pH2.0) では多くの遺伝子で発現の変動が見られ、環境応答性が示されました。さらに、この株ではアミノ酸置換を伴う変異が確認されなかったことも特筆されます。加えて、m1 株では出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のアミノ酸トランスポーター遺伝子 *LYP1* と高い相同性を持つ遺伝子の発現が低下しており、実際に *LYP1* 遺伝子を破壊した *S. cerevisiae* 株では、低 pH 環境下での生育が改善されました。このことから、この遺伝子が pH 耐性に関与している可能性が示唆されました。m1 株のさらなる利点として、増殖速度が低下しておらず、TAQing 法により様々な表現型の変異株が効率よく取得できる可能性が示されました。今回の研究を通じて、外来核酸を用いることなくゲノム構造を改変し、かつ増殖性を維持した高機能変異株の取得が可能であることが実証されました。また、責任変異が比較的少数でありながら、培養を繰り返してもその表現型が安定して維持されることも確認されました。最後に、得られた m1 株は低 pH 環境下でも生育可能であることから、コンタミネーションのリスク低減や復帰変異株の出現抑制といった産業的利点も期待できると述べられ、講演を締めくくられました。

質疑応答では以下のような議論が行われた。

- ・ *LYP1* 遺伝子の破壊株が低 pH で生育できる理由・メカニズムは？  
—プロトンとの共役トランスポーターなのでプロトンが影響している可能性があるが、現時点ではよくわかっていない。
- ・ 特定の遺伝子発現は non-GM ではどのようにしているか？  
—特定の遺伝子発現している場合の表現型がわかれば、その表現型を指標に選択圧を設定することが可能ではないか。
- ・ トルラ酵母で求められる表現型として、低 pH での生育以外にはないか？  
—培養後に菌体が凝集していると、菌体を調製する際に遠心分離ではなく、菌体を回収可能なので、凝集株が取得できればと考えている。
- ・ トルラ酵母の *LYP1* 以外のカチオン性アミノ酸トランスポーターの破壊株で耐酸性は見ているか？  
—まだ調べていない。
- ・ 酸などのストレス耐性ではなく、菌体内の機能性成分を高生産させることは可能か？  
—特定のトルラ酵母で突然変異を利用して、NAD 高生産株などを取得しているので TAQing 技術を用いることで可能ではないかと考えている。
- ・ TAQing で孢子形成するトルラ酵母は取得可能か？

—それはぜひ試してみたい。

配偶子の遺伝的多様性創出に関わる減数分裂時組換えに関する研究をされていた太田氏が、それまでの研究成果を基に大規模ゲノム改変を可能にする新しい技術を開発され、さらにそれが基礎研究、応用研究に広く利用されていることが印象に残りました。アカデミアと企業との密接な連携が特徴である酵母研究の、今後のさらなる可能性を実感するセミナーとなったと思います。我が国発のこの技術が今後より多くの生物種に適用され、画期的成果が生み出されることを期待しています。

以上